

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

09/807223

JC Rec'd PCT/PTO 11 APR 2001

011755184

WPI Acc No: 1998-172094/*199816*

XRAM Acc No: C98-055132

New recombinant adeno-associated virus vector - expressed by transformed cell lines, useful for, e.g. gene therapy

Patent Assignee: HISAMITSU PHARM CO LTD (HISM)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 10033175	A	19980210	JP 96213101	A	19960724	199816 B

Priority Applications (No Type Date): JP 96213101 A 19960724

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 10033175	A		8 C12N-015/09	

Abstract (Basic): JP 10033175 A

The following are claimed: (1) an adeno-associated virus (AAV) genomic sequence having a stuffer sequence between two recombinase recognition sequences of translation starting codons of a promoter p5 and rep78/68 genes, in which the stuffer sequence contains at least 1 detectable gene marker and poly-A signal in the same directions of promoter p5 and rep78/68 genes; (2) the recombinase recognition sequence of loxP sequence recognised with recombinase Cre and an antibiotic resistant genetic marker; (3) a recombinant AAV vector comprising the recombinant AAV plasmid and Cre gene, and (4) a stable cell line transformed with the vector.

ADVANTAGE -The products can be used in gene therapy.

Dwg. 0/2

Title Terms: NEW; RECOMBINATION; ADENO; ASSOCIATE; VIRUS; VECTOR; EXPRESS; TRANSFORM; CELL; LINE; USEFUL; GENE; THERAPEUTIC

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/09

International Patent Class (Additional): C12N-005/10

File Segment: CPI

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-33175

(43) 公開日 平成10年(1998) 2月10日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C12N 15/09		9282-4B	C12N 15/00	A
5/10			5/00	B

審査請求 未請求 請求項の数 5 F D (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平8-213101

(22) 出願日 平成 8 年(1996) 7 月24日

(71) 出願人 000160522

久光製薬株式会社

佐賀県鳥栖市田代大官町408番地

(72) 発明者 飯島 修

茨城県つくば市観音台 1 丁目25番11号 久

光製薬株式会社筑波研究所内

(72) 発明者 佐藤 秀次

茨城県つくば市観音台 1 丁目25番11号 久

光製薬株式会社筑波研究所内

(72) 発明者 斎藤 泉

東京都渋谷区代々木 2 -37-15-412

(72) 発明者 島田 隆

東京都文京区弥生 1 - 5 - 8 -203

(74) 代理人 弁理士 村山 みどり

(54) 【発明の名称】 組換えアデノ随伴ウイルスベクターの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 組換えアデノ随伴ウイルスベクターを大量に安定して製造するための方法を提供する。

【解決手段】 アデノ随伴ウイルスゲノム配列中、プロモーター p 5 と r e p 7 8 / 6 8 遺伝子の翻訳開始コードンの間に、2つのリコンビナーゼ認識配列に挟まれたスタッファー配列が挿入された遺伝子配列。前記遺伝子配列を動物細胞に遺伝子導入することにより得られる細胞株。前記遺伝子配列、組換えアデノ随伴ウイルスベクタープラスミドおよび C r e 遺伝子を導入して得られる組換えアデノ随伴ウイルスベクターの製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アデノ随伴ウイルスゲノム配列中に2つのリコンビナーゼ認識配列に挟まれたスタッパー配列が挿入された遺伝子配列であって、リコンビナーゼ認識配列の挿入部位が、プロモーターp5とrep78/68遺伝子の翻訳開始コドンの間であり、スタッパー配列が、プロモーターp5およびrep78/68遺伝子と同方向の少なくとも1つの検出可能な遺伝子マーカーとポリAシグナルを含有することを特徴とする遺伝子配列。

【請求項2】 リコンビナーゼ認識配列がリコンビナーゼCreにより認識されるloxP配列であり、遺伝子マーカーが抗生物質耐性遺伝子である請求項1に記載の遺伝子配列。

【請求項3】 請求項1または2に記載の遺伝子配列、組換えアデノ随伴ウイルスベクタープラスミドおよびCre遺伝子を導入して得られることを特徴とする、組換えアデノ随伴ウイルスベクターの製造方法。

【請求項4】 請求項1または2に記載の遺伝子配列の導入を、組換えアデノウイルスベクターを用いて行うことを特徴とする請求項3に記載の組換えアデノ随伴ウイルスベクターの製造方法。

【請求項5】 請求項1または2に記載の遺伝子配列を動物細胞に導入して得られる、該遺伝子配列が細胞のゲノム中に安定的に組み込まれた細胞株。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、組換えアデノ随伴ウイルスベクター（以下、組換えAAVベクターと言う）の製造方法、それに用いる遺伝子配列および細胞株に関する。

【0002】

【従来の技術】近年の遺伝子工学の急速な発展により、様々な分子生物学的手法の開発が行われてきた。それに伴い、遺伝子情報の解析および遺伝子の機能解析において著しい進歩が見られ、そこから得られた成果を実際の治療現場に還元しようとする試みが数多く行われている。その中でも、最も進歩の著しい分野の一つとして遺伝子治療分野が挙げられる。種々の遺伝性疾患における原因遺伝子の発見、解読が行なわれる一方、それらの遺伝子を物理的および化学的手法により細胞内に導入する方法が開発され、遺伝子治療は、基礎的実験の段階から実際の臨床応用が行なわれるまでに発展してきている。

【0003】家族性高コレステロール血症やアデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症等の先天性疾患や、後天的遺伝病と考えられる癌、エイズ等の原因に遺伝子の異常の関与が明らかになるにつれて、患者の体細胞に遺伝子を導入することにより疾患を治療する遺伝子治療は、新しい治療法として注目されるようになった。遺伝子治

療の臨床応用例としては、1989年、米国において、初めての遺伝子治療の臨床試験が行なわれて以来、すでにイタリア、オランダ、フランス、イギリス、中国においても臨床試験が開始されている。特に、米国においては、1995年6月までに、81の遺伝子治療プロトコールがNIHの組換えDNA委員会(RAC)で承認され、約500人が遺伝子治療を受けている。

【0004】遺伝子治療は、遺伝子導入する細胞(標的細胞)の種類によって、生殖細胞遺伝子治療(Germ Cell Gene Therapy)と体細胞遺伝子治療(Somatic Cell Gene Therapy)に分類されている。また、異常(原因)遺伝子をそのままにして、新しい(正常)遺伝子を付け加える付加遺伝子治療法(Augmentation Gene Therapy)と、異常遺伝子を正常遺伝子で置き換える置換遺伝子治療法(Replacement Gene Therapy)に分類されているが、現時点では倫理的および技術的制約から、体細胞に対する付加遺伝子治療のみが行なわれている。

【0005】このような遺伝子治療の臨床応用における大きな技術的課題は、いかにして、外来遺伝子を効率良く安全に標的細胞へ導入するか、ということである。1980年初期には、マイクロインジェクション等の物理的手法の応用が試みられたが、遺伝子の導入効率が低く、安定に導入することができず、さらには当時の大量細胞培養技術の限界があり、実用化にはつながらなかった。その後、外来遺伝子を効率良く標的細胞に導入するためのベクターとなる組換えウイルス(ウイルスベクター)が開発され、初めて遺伝子治療の臨床応用が可能となった。

【0006】現在行なわれている遺伝子治療において、最も広く使用されているウイルスベクターは、マウス白血病ウイルス(MoMLV: Moloney Murine Leukemia Virus)由来のレトロウイルスベクターで、宿主染色体DNAに組み込まれ、長期間の遺伝子発現が期待できる。MoMLVベクターは、最も研究の進んだウイルスベクターで、ウイルスの調製も容易であり、臨床遺伝子治療においても、ほとんどすべてのプロトコールに使用されており、その有効性も明らかにされているが、サルを使った安全性試験で、増殖性のウイルス(RCR: Replication Competent Retrovirus)によるリンパ腫の発症が報告された。しかし、RCRを検出する系が開発され、厳重なチェックも行なわれており、現在臨床で使用されているベクターにRCRが混入する心配はない。また、染色体への組み込みの際に発癌遺伝子の活性化または癌抑制遺伝子の不活性化に伴う癌の発症の危険性もあるが、極めて理論的な可能性にすぎないと考えられている(K. Cornetta, et al., Hum. Gene Ther., 205-14, 1991)。

【0007】HIV(ヒト免疫不全ウイルス)は、ウイルス自体の宿主特異性により、CD4陽性Tリンパ球に対して特異的に感染するウイルスであり、HIVベクタ

一は、CD4陽性Tリンパ球に対して特異的遺伝子導入を可能とするベクターとして開発された (T. Shimada, et al., J. Clin. Invest., 88, 1043, 1991)。リンパ球は、先天性免疫不全症、AIDS、癌等の遺伝子治療を行なう際に重要な標的細胞となっているため、HIVベクターは、CD4陽性Tリンパ球を標的細胞とした今後の遺伝子治療に大きく貢献するものと期待されている。このHIVベクターの最大の欠点として、野生株の混入の可能性という問題があるが、それが解決されれば、血管内直接投与法によるin vitroの遺伝子治療に使用することができる可能性がある。

【0008】アデノウイルスベクターは、現時点で遺伝子導入効率が最も高く、気道上皮細胞、肝細胞、筋細胞等へin vitroで高率で遺伝子導入できることが報告されている (S. Teramoto, et al., Hum. Gene Ther., 6, 1039, 1995, B. Quantin, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 89, 2581, 1992)。しかし、アデノウイルスベクターは、ゲノムDNAを宿主染色体DNAに組み込むことができないので、長期間の遺伝子発現を期待することができず、しかも、アデノウイルス粒子自体の細胞毒性に起因するとみられる炎症反応が発生すると言われている。

【0009】一方、アデノ随伴ウイルス (AAV: Adeno-Associated Virus) ベクターは、ゲノムDNAを宿主染色体DNAへ組み込むことができ、野生型AAV自体が非病原性である (N. Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158, 97, 1992) 等、これまでのベクターにない性質を持っている。AAVベクターは、造血幹細胞等の非分裂細胞へも遺伝子導入ができることや、第19染色体に選択的に遺伝子導入することができる等の特徴がある (M. Suwado and R. G. Roder, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82, 4394, 1985)。また、AAV粒子は物理的に安定であるため、ショ糖密度勾配超遠心法や硫酸セルロースアフィニティークロマトグラフィー等による濃縮により遺伝子導入効率の高いベクターを調製することが可能である (K. Tamayose, et al., Hum. Gene Ther., 7, 507, 1996)。

【0010】AAVは、自己複製能の欠損したウイルス (dependent virus 属) であり、増殖にはヘルパーウイルスであるアデノウイルスの存在が必要である。これまで、AAVベクターは用時、ヘルパープラスミドとベクタープラスミドのコトランスフェクションとアデノウイルスの感染を同時に行なうことによって調製されていた (R. M. Kotin, Hum. Gene Ther., 5, 793, 1994)。しかし、リン酸カルシウム法に代表されるトランスフェクション法は、①細胞への遺伝子導入効率に限界があり、臨床の場で必要とされる高い力価のウイルスベクターを得ることは困難である、②いくつかのロットに分けてトランスフェクションを行なった場合に、各ロット間の遺伝子導入効率にバラツキが生じ、一定の力価のウイルスベクターを安定的に供給することができない、③トランスフェ

クションの操作が複雑であるために、一度に大量のベクターを調製するのは困難である、④大量のAAVベクターを調製するためには、それに見合うトランスフェクション用の大量のプラスミドを調製する必要がある、等のいくつかの問題点が存在する。

【0011】このような問題点を解決する手段として、ヘルパープラスミドおよび/またはパッケージングプラスミドを、ウイルスベクター産生細胞のゲノムDNAに組み込んだパッケージング細胞が考案されている。この細胞株は、プラスミド由来のDNAがゲノムDNAに安定的に組み込まれているため細胞分裂の際にも娘細胞に受け継がれることから、任意の規模で培養することにより、必要に応じた量の組換えウイルスを安定的に得ることができる。一般的に、これらのパッケージング細胞株の樹立は、ネオマイシン耐性遺伝子や、ハイグロマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子を保持したヘルパープラスミドおよび/またはパッケージングプラスミドを、ウイルスベクターを産生させるための細胞にトランスフェクションすることにより行われ、その細胞を抗生物質を含有する培地で長期間培養することにより、ゲノムDNAにプラスミド由来の遺伝子が組み込まれたパッケージング細胞が得られる。これらの方法により、既にMoMLVベクターにおいては、PA317 (A. D. Miller, et al., Sowat. Cell Mol. Genet. 12, 175, 1986) やΨ2 (R. Mann, et al., Cell, 33, 153, 1982, 3) 等の種々のパッケージング細胞株が確立され、実際の遺伝子治療におけるベクターの調製に利用されている。

【0012】このような観点から、AAVベクターを産生し得るパッケージング細胞株の確立が強く望まれてきた。従来、AAVベクターの調製には、アデノウイルスのE1A、E1B遺伝子を恒常的に発現している293細胞が用いられており、この細胞でパッケージング細胞株を樹立する試みがなされているが、AAVベクターを産生するパッケージング細胞株を樹立したという報告はない。

【0013】アデノウイルスのE1a蛋白質は、AAVのp5プロモーターからの転写を誘導し、AAVのREP蛋白質が発現する。REP蛋白質は、AAVゲノムが第19染色体に選択的に遺伝子導入される際に必要な蛋白質であると同時に、細胞の増殖を抑制し、蛋白質の合成系をAAV粒子を作らせる方向に向わせると言われている。また、アデノウイルスのE1BとE4はmRNAの蓄積、E2AとVAはmRNAのスプライシングと翻訳に必要であると考えられている (N. Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158, 97, 1992)。そのため、前記293細胞では、アデノウイルスの混入がなくてもp5プロモーターが活性化され、REP蛋白質が発現する。このREP蛋白質を恒常的に発現させると細胞の増殖阻害が起こるため、293細胞でのパッケージング細胞株の樹立は不可能であった。

【0014】一方、パッケージング細胞の樹立の際に障害となるrep遺伝子産物の細胞への毒性を回避するために、AAVベクターに組み込まれるベクタープラスミド由来の遺伝子配列のみを導入して樹立したパッケージング細胞に対して、repおよび/またはcap遺伝子をコードする遺伝子を公知の方法により導入し、AAVベクターを調製する方法も考えられている。このrepおよび/またはcap遺伝子をコードする遺伝子配列の細胞への導入法には、大きく分けて、組換えウイルスを用いる方法と用いない方法があるが、組換えアデノウイルスを用いる方法が遺伝子導入効率がよく、力価がより高いAAVベクターを産生する上で都合がよい。パッケージング細胞に293細胞を使用した場合には、この細胞にすでにアデノウイルスのE1遺伝子が保持されているため、組換えAAVベクターを製造する際、野生型アデノウイルスではなく、E1欠損型アデノウイルスを感染させるだけでも、組換えAAVベクターを製造することができる。そこでこのE1欠損領域にAAVのrepおよび/またはcap遺伝子をコードする遺伝子配列を組み込んだ組換えアデノウイルスによってREPおよび/またはCAP蛋白を供給する方法が考えられた。しかしながら、公知のCOS-TPC法(鐘ヶ江ら、実験医学 Vol.12, No.3, 1994, S. Miyake. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 93, 1320, 1996、特開平8-84589号、同7-298877号)により組換えアデノウイルスを調製しようとする、293細胞においてREP蛋白の発現が起こるため、rep遺伝子をゲノム配列内に保持した組換えアデノウイルスを得ることができない。

【0015】

【発明が解決しようとする課題】以上説明したように、AAVベクターは、遺伝子治療分野において使用実績のあるMoMLVベクターに代わる新規ウイルスベクターとして期待されているものの、その調製方法は完成されていない。本発明は、上記のような事情に鑑みてなされたものであり、その目的は、組換えAAVベクターを効率的に製造する方法を提供することにある。

【0016】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、組換えAAVベクターの製造方法、それに使用する遺伝子配列および組換えAAVベクターパッケージング細胞株を開発することに成功し、本発明を完成させた。

【0017】即ち、本発明は、アデノ随伴ウイルスゲノム配列中に2つのリコンビナーゼ認識配列に挟まれたスタッファー配列が挿入された遺伝子配列であって、リコンビナーゼ認識配列の挿入部位が、プロモーターp5とrep78/68遺伝子の翻訳開始コドンの間であり、スタッファー配列がプロモーターp5およびrep78/68遺伝子と同方向の少なくとも1つの検出可能な遺

伝子マーカースとポリAシグナルを含有することを特徴とする遺伝子配列である。本発明はまた、リコンビナーゼ認識配列がリコンビナーゼCreにより認識されるloxP配列であり、遺伝子マーカースが抗生物質耐性遺伝子である前記遺伝子配列である。本発明はまた、前記遺伝子配列、組換えアデノ随伴ウイルスベクタープラスミドおよびCre遺伝子を導入して得られることを特徴とする、組換えアデノ随伴ウイルスベクターの製造方法である。本発明はまた、前記遺伝子配列の導入を、組換えアデノウイルスベクターを用いて行うことを特徴とする前記組換えアデノ随伴ウイルスベクターの製造方法である。本発明はまた、前記遺伝子配列を動物細胞に導入して得られる、該遺伝子配列が細胞のゲノム中に安定的に組み込まれた細胞株である。

【0018】

【発明の実施の形態】以下、本発明を好適例により詳しく説明する。最初に、野生型AAVのゲノムの5'末端側のITRおよび3'末端側のITR配列の間の構造遺伝子を切り出し、それ自身はパッケージングされず、組換えAAVベクターの産生に必要な蛋白質を発現することを可能とする遺伝子配列を保持するヘルパープラスミドを、公知の方法により構築する。ここで、野生型AAVのITR (inverted terminal repeat) とは、AAVのゲノムDNAの両末端に存在する145塩基の配列であって、T型のヘアピン構造を持ち、ウイルスの複製、パッケージング、染色体への組み込み等に必須である

(R. Samulski, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 79, 2077, 1982)。このヘルパープラスミドにはプロモーター配列がなく、AAV由来のプロモーターからのみAAV遺伝子は発現される。

【0019】次に、このようにして得られたヘルパープラスミドのプロモーターp5とrep78/68遺伝子の翻訳開始コドンとの間に、2つのリコンビナーゼ認識配列に挟まれたスタッファー配列を挿入する。リコンビナーゼ認識配列は、リコンビナーゼCreにより認識される、DNA上の34塩基からなるloxP配列と称される特異的認識配列であることが好ましい。このスタッファー配列にポリAシグナルを組み込むことにより、プロモーターp5からの転写産物はこのポリAシグナルのところでポリAが付加され、その下流のrep78/68遺伝子の発現は抑制される。このようにして得られたヘルパープラスミドでのrep78/68遺伝子の発現は、Cre-loxPシステムによる遺伝子発現のON/OFF制御機構により、Cre蛋白質により制御される。Cre-loxPシステムによる遺伝子発現のON/OFF制御機構とは、大腸菌P1ファージ由来のリコンビナーゼであるCre蛋白質が、loxP配列に結合して、2つのloxP配列に囲まれたDNA (スタッファー配列) を切り離す性質を利用したものであり、2つのloxP配列の間には任意のDNAを組み込むことが

できる (M. Barinaga, Science, 265, 26, 1994)。このスタッファー配列には、5'末端の上流からプロモーターと抗生物質耐性遺伝子とポリAシグナルを組み込むことにより、細胞へのトランスフェクション後の薬剤による選択を容易に行うことができる。ただし、組換えAAVベクターの製造に用いるヘルパープラスミドは、パッケージング細胞を293細胞とすることにより、p5からの転写で抗生物質耐性遺伝子を働かせることができるため、スタッファー配列にプロモーターを組み込むことは必ずしも必要ではない。抗生物質耐性遺伝子としては、特に限定されないが、ネオマイシン耐性遺伝子が好ましい。

【0020】次に、このようにして得られたヘルパープラスミドを293細胞に遺伝子導入することにより、該ヘルパープラスミドがゲノム中に安定的に組み込まれた組換えAAVベクター産生用パッケージング細胞を得る。遺伝子導入は、293細胞にリン酸カルシウム法等の公知の方法 (M. Kringsler, Gene Transfer and Expression Protocol, a Laboratory Manual, Oxford University Press, 1990) によるトランスフェクションを行い、トランスフェクタントを薬剤の存在下で長期間培養して、安定的にヘルパープラスミドが組み込まれた組換えAAVベクター産生用のパッケージング細胞を選択することにより行われる。さらに、得られたクローンから、組換えAAVベクターをより多く産生する細胞株を選択することが好ましい。

【0021】次に、このAAVベクター産生用パッケージング細胞を用いて、新規の組換えAAVベクターを製造する。まず、pSub201に代表される、野生型AAVをコードするプラスミドのゲノムの5'末端側のITRと3'末端側のITR配列間の野生型AAVゲノム配列が、少なくとも1つの遺伝子マーカーおよび/または治療用遺伝子で置換されている組換えAAVベクタープラスミドを公知の方法により構築する。前記遺伝子は、少なくとも1つのプロモーターとポリAシグナルを含み、プロモーターとしては、ヒト単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼのプロモーターが好ましい。さらに、ネオマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子を選択のために組み込むこともできる。

【0022】このようにして得られた組換えAAVベクタープラスミド (ベクタープラスミド) とCre発現プラスミドを、上記のパッケージング細胞に対して、トランスフェクションし、同時にアデノウイルスをMoil0程度となるように感染させる。アデノウイルスは、細胞の状態によって任意の時間に感染させることができるが、トランスフェクションの1時間前に感染させることが望ましい (K. Tamayose, et al., Hum. Gene Ther., 7, 507, 1996)。その後、数日間培養することにより、組換えAAVが産生される。この方法によれば、すでにヘルパープラスミドが全ての細胞に組み込まれているので、

ヘルパープラスミドとベクタープラスミドをコトランスフェクションする必要がなく、両者をコトランスフェクションした場合に比べて、高い力価の組換えAAVベクターが産生される。また、用いる細胞の数を任意に変えることにより、必要に応じた量の組換えAAVベクターを製造することができる。また、ベクタープラスミドをさらにトランスフェクションし、ベクタープラスミドを保持する産生細胞を選択することにより、ベクタープラスミドとヘルパープラスミドの両方を安定的に保持した細胞株が得られることから、上記の組換えAAVベクターの製造工程はより簡単になる。

【0023】さらに、前記rep遺伝子の発現制御機構によって、rep遺伝子を導入した293細胞であっても増殖阻害が起きず、従来不可能であった、COS-TPC法によるrep/cap遺伝子をゲノム配列内に保持した組換えアデノウイルス (AAV蛋白発現アデノウイルス) を製造することが可能となる。即ち、組換えアデノウイルスベクター構築用のコスミドpAdex1w (S. Miyake, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 93, 1320, 1996) に、前記のスタッファー配列により発現を制御させたAAVゲノムを組み込み、このコスミドを用いて、COS-TPC法によりAAVゲノムを保持した組換えアデノウイルスを得ることができる。

【0024】このようにして得られたAAV蛋白発現アデノウイルスとCre発現アデノウイルスの2つの組換えアデノウイルスを、ベクタープラスミドを既に保持する293細胞に同時にMoil0程度となるように感染させることによって、組換えAAVベクターを製造することができる。組換えアデノウイルスを用いることにより、細胞への遺伝子導入効率が1細胞当たり20コピー前後と高くなり、力価がより高いAAVベクターを産生することが可能となる。

【0025】また、次に示すような切り出し発現型のシステムによってもAAVベクターを製造することができる。即ち、遺伝子の配列を、5'末端からloxP、rep78/68翻訳開始コドンから始まるAAVゲノム (ただし5'末端および3'末端のITRを除く)、ポリAシグナル、p5プロモーター、loxPとしたヘルパープラスミドを構築する。このプラスミドにCre蛋白質を作用させるとloxP配列間で切り出しが行われ、loxPで挟まれたDNAが環状化される。環状化によってp5プロモーターとrep78/68遺伝子の翻訳開始コドンが、その間にloxP配列を含むだけで隣接することになり、rep遺伝子の発現が可能となる。よって、このシステムによっても組換えAAVベクターはCre蛋白質誘導型に製造されることができる。

【0026】組換えAAVベクターは、細胞の核膜中に存在するため、細胞を超音波破砕したり、凍結、融解して細胞を破砕することにより、高い力価の組換えAAVベクターを得ることができる。さらに、組換えAAVベ

クターのウイルス粒子は、他のウイルス粒子よりも物理化学的に安定であることを利用して、当業者に公知の方法 (K. Tamayose, et al., Hum. Gene Ther., 7, 507, 1996) により、ベクター溶液を56℃、30分間熱処理することにより、混入するアデノウイルスを不活性化することができる。

【0027】

【実施例】以下、本発明を実施例および図面によりさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。尚、特に断らない限り、全てのDNA操作およびプラスミドの構築は公知の方法 (J. Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989) を用いて行なった。

【0028】実施例1

(ヘルパープラスミドpLNAAVおよびpLNLA Vの構築) 野生型アデノ随伴ウイルスの全ゲノム配列をコードするプラスミドp sub 201 (R. J. Samulski, et al., J. Virol., 63, 3822, 1989) から、制限酵素Xba I (Gibco社製) を用いて、当該ゲノムの5'末端側のITR配列と3'末端側のITR配列に挟まれた、その遺伝子配列は組換えAAVベクター粒子内にパッケージングされず、組換えAAVベクターの産生に必要な蛋白質を発現することを可能とする遺伝子配列を切り出した。この遺伝子配列を、プラスミドpUC18 (Gibco社製) のXba I部位に組み込み、ヘルパープラスミドpLNAAV (本プラスミドは下記試験例において比較例として用いた) を構築した。

【0029】次に、ヘルパープラスミドpLNAAVのAAVゲノムに、特定部位突然変異誘発 (T. A. Kunkel, et al., Methods in Enzymology, 154, 367, 1987) により、p5プロモーターとrep78の翻訳開始コドンとの間に、BamHI制限酵素部位を作製し、サンガーのDNA配列決定法 (F. Sanger, et al., Proc. Nati. Acad. Sci. U. S. A., 74, 5463, 1977) により制限酵素部位の塩基配列を決定した。この部位に、2つのloxP配列に挟まれたスタッファー配列を、AAVゲノムと同一方向に挿入して、Cre蛋白質による発現誘導型のヘルパープラスミドpLNLA Vを構築した (図1)。スタッファー配列には、ネオマイシン耐性遺伝子およびSV40ポリAシグナルを組み込んだものを用いた。

【0030】実施例2

(ヘルパープラスミドpLNLA VおよびpLNAA Vの293細胞への遺伝子導入) 本実施例では、実施例1において得られたヘルパープラスミドpLNLA Vの293細胞へのトランスフェクションを示す。トランスフェクションは、公知のリン酸カルシウム法 (M. Krin-gler, Gene Transfer and Expression Protocol, A Laboratory Manual, Oxford University Press, 1990) により行った。10%牛胎児血清 (Gibco社製) および抗生物

質を補充したダルベッコ改良イーグル培地DMEM (Gibco社製) 中に維持されていた293細胞を、9cmの皿で、約70%のコンフルエントの状態に達するまで培養した。実施例1において得られたヘルパープラスミドpLNLA V 20μgに、滅菌水および塩化カルシウム水溶液を添加して、全量を0.5mlとした。得られた混合液を、HBSP緩衝液0.5ml中に振盪しながら滴下した後、室温で30分間放置し、プラスミド-リン酸カルシウム共沈物を得た。この共沈物を、前記の293細胞の培養液中に添加して、CO₂インキュベーター内で4時間インキュベーションした後、新鮮な培養液で置換して、さらに2日間インキュベーションした。また、比較例1として、実施例1に記載したヘルパープラスミドpLNAA Vを用いて、293細胞への遺伝子導入実験を行った。ヘルパープラスミドpLNAA V 20μgとネオマイシン耐性遺伝子を保持したpMC1Neo (Stratagene社製) 1μgを同様の方法で、293細胞にトランスフェクションした。陽性対照群として、pUC18を20μgとネオマイシン耐性遺伝子を保持したpMC1Neo 1μgを同様の方法で、293細胞にトランスフェクションした。

【0031】次に、トランスフェクタントのみを選択するために、PBS (-) で細胞を2度洗浄した後、トリプシン-EDTA混液により細胞を培養皿から剥がし、新しい9cmの培養皿に再播種した。細胞が培養皿に接着したのを確認した後、ネオマイシンの類縁物質であるG418 (Gibco社製) を、最終濃度が1000μl/mlになるように培養液中に添加した。これを、CO₂インキュベーター内で10日間インキュベーションし続けた後、生き残った細胞集団 (コロニー) を1つずつ分離し、新鮮な培養液中でさらにインキュベーションを続け、ネオマイシン耐性細胞株 (パッケージング細胞) を得た。これに対して、比較例1ではネオマイシン耐性を示す細胞株は得られなかった。一方、陽性対照群ではAAVゲノムが含まれず、rep遺伝子の発現がないため、ネオマイシン耐性細胞株が得られた。それぞれの結果を、ネオマイシン耐性コロニー数として表1に示す。

【0032】

【表1】

ネオマイシン耐性コロニー数

実施例1	253
比較例1	0
陽性対照群	55

【0033】試験例1

(ヘルパープラスミドpLNLA Vのスタッファー配列がCre蛋白質により切り出されることの確認) 実施

例1において得られたヘルパープラスミドpLNLAAVのスタッパー配列がCre蛋白質存在下で切り出されることをPCR法により確認するために、ヘルパープラスミドpLNLAAVの2つのloxP配列を挟むプライマーを設計し(図2)、Cre発現アデノウイルスベクターAxCANCre(Y. Kanegae, et al., Nucl. Acids Res., 23, 3816, 1995)を感染させたパッケージング細胞からゲノムDNAを抽出し、PCR反応を行った。ここで用いられるCre遺伝子を保持した組換えアデノウイルスベクターAxCANCreは、公知の方法(鐘ヶ江ら、実験医学、Vol. 12, No. 3, 1994, S. Miyake, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 93, 1320, 1996)により、COS-T-PC法で調製した。PCR反応の結果、Cre発現アデノウイルスベクターAxCANCreを感染させた細胞でのみ、スタッパーが切り出されるときに得られる553bpのバンドが検出された。

【0034】実施例3

(樹立したパッケージング細胞を用いた組換えAAVベクターの調製) 実施例2において樹立したパッケージング細胞を用い、組換えAAVベクターを調製した。即ち、該パッケージング細胞を9cmの培養皿で、70%コンフルエントの状態に達するまで培養した。トランスフェクションの1時間前に、培養液を、FCSを含まないDMEM1mlで交換して、Cre発現アデノウイルスベクターAxCANCreを、Moi10程度となるように感染させた。次に、組換えAAVベクタープラスミドpNAV(K. Tamayose et al., Hum. Gene Ther., 7, 507, 1996)10μgを用い、実施例2に記載した方法と同様の方法によりプラスミド-リン酸カルシウム共沈物を調製し、これを1時間後に10%FCSを含むDMEM8mlを加えた上記培養皿に添加した。さらに、CO₂インキュベーター内に4時間放置した後、新鮮な培養液6mlで置換して、さらに2日間インキュベーションした。細胞を培養液ごとにかき集め、凍結、融解を繰り返して、細胞を破壊した後、300rpmで10分間遠心分離して細胞残渣を除去し、組換えAAVベクター溶液を得た。

【0035】試験例2

(組換えAAVベクターの力価の測定) 実施例3で得られたベクター溶液の検定を、3T3細胞を用いたバイオアッセイ法により行なった。また、陰性対照群として、トランスフェクションを行なわなかったパッケージング細胞の上清液を添加した群についても、同様の検討を行なった。最初に、1×10⁵個の3T3細胞を4cmの培養皿に播種し、CO₂インキュベーター内に一晩放置し

た。細胞をPBS(-)で2度洗浄した後、上記ベクター溶液10μlおよびFCSを含まないDMEM1mlを添加した。これをCO₂インキュベーター内に4時間放置した後、10%FCSを含むDMEM3mlを添加し、CO₂インキュベーター内で2日間インキュベーションし、細胞をPBS(-)で洗浄した後、トリプシン-EDTA混液で細胞を培養皿から剥がし、新しい9cmの培養皿に再播種した。細胞が培養皿に接着したのを確認した後、ネオマイシンの類縁物質であるG418(Gibco社製)を前記培養液中に最終濃度が1000μl/mlとなるように添加した。これを、CO₂インキュベーター内で10日間インキュベーションし続けた後、生き残った細胞集団(コロニー)をクリスタルバイオレットにより染色した。その結果、実施例2により調製されたパッケージング細胞を上記の方法により処理し、得られたベクター溶液を3T3細胞に作用させた群においては、多数のコロニーが観察された。これに対して、陰性対照群では、G418に対して耐性を示すコロニーが全く認められなかった。

【0036】これらの結果は、①rep蛋白質の発現が抑制されたことにより293細胞の細胞増殖阻害が起らず、②Cre蛋白質依存的にスタッパーが切り出され、rep遺伝子が発現するという系が完全に機能していることを証明するものである。さらに、③実施例2に示す方法により得られるパッケージング細胞に対して、ベクタープラスミドとCre発現アデノウイルスベクターを同時に作用させることにより、組換えAAVベクターを調製することができることを証明するものである。従って、本発明の方法によれば、従来技術では不可能であった293細胞を用いてAAVベクターパッケージング細胞を製造し、さらにその細胞を用いて組換えAAVベクターを製造する方法が提供されることが判明した。

【0037】

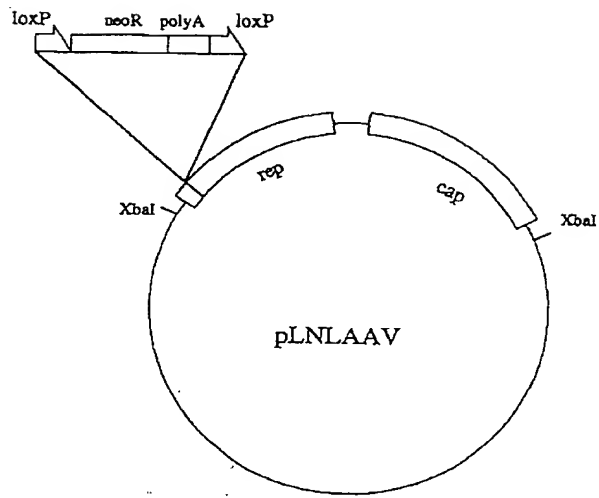
【発明の効果】本発明によれば、組換えAAVベクターを大量に、しかも安定して製造することができる方法が提供される。本発明の方法は、遺伝子治療を初めとする医学、生化学等の分野において極めて応用範囲が広い。

【図面の簡単な説明】

【図1】 Cre蛋白質による発現誘導型のAAVゲノムを保持するヘルパープラスミドpLNLAAVの構造を示す模式図である。

【図2】 PCR法に用いたスタッパー配列を挟むrep遺伝子中のプライマーの位置を示す模式図である。

【図 1】



【図 2】

